

УТВЕРЖДАЮ



Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

25 марта 2016 г.

Регистрационный № 255-1215

**МЕТОД ОЦЕНКИ РИСКА ПРОГРЕССИРОВАНИЯ
АТЕРОСКЛЕРОЗА У ПАЦИЕНТОВ С ПСОРИАЗОМ И
ПСОРИАТИЧЕСКИМ АРТРИТОМ**

Инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы
народов медицинский университет»

АВТОРЫ: Сергиевич А.В.

д.м.н., профессор Литвяков А.М.

Витебск, 2015

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) представлен метод оценки риска прогрессирования атеросклероза у пациентов с псориазом и псориатическим артритом, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на профилактику развития атеросклеротических изменений артерий и опасных для жизни осложнений, вызываемых развитием у этой группы пациентов атеросклероза. Применение данного метода позволит более эффективно выявлять пациентов, нуждающихся в динамическом наблюдении, обследовании с целью определения гемодинамической значимости артериальных стенозов и/или назначении профилактического лечения, что позволит снизить длительность временной нетрудоспособности, сроки госпитализации и инвалидизацию пациентов.

Инструкция предназначена для врачей-ревматологов и врачей-дерматологов учреждений здравоохранения областного и республиканского уровня.

Перечень медицинских изделий, лекарственных средств, реактивов и

т.д.

1. Визуальная аналоговая шкала (ВАШ).
2. Набор для определения сывороточной концентрации аргиназы I.
 - 2.1. Антитела, покрывающие микротитровальные стрипы планшета.
 - 2.2. Конъюгат раствор.
 - 2.3. Растворитель для стандарта.
 - 2.4. Буфер разбавления.
 - 2.5. Раствор субстрата.
 - 2.6. Стоп раствор.
 - 2.7. Мастер стандарт человеческой аргиназы.

- 2.8. Контроль качества (высоко, низко).
- 2.9. Концентрат промывочного раствора (10х).
- 3. Деионизированная вода.
- 4. Пробирки для разведения образцов.
- 5. Цилиндры для разведения промывочного раствора и разведения буфера.
- 6. Пипетки объемом 10-1000 мкл (вари).
- 7. Унипипетка на 100 мкл.
- 8. Одноразовые наконечники.
- 9. Абсорбирующий материал для опрокидывания планшет после промывки.
- 10. Вортекс для перемешивания растворов.
- 11. Шейкер для ИФА.
- 12. Восьмиканальная пипетка 50-300 мкл.
- 13. Микропланшеточный ридер с длиной волны 450 нм.
- 14. Центрифуги лабораторные.
- 15. Пробирки конические центрифужные.

Показания к применению

- 1. Псориатический артрит.
- 2. Псориаз.

Противопоказания к применению

Противопоказаний к применению нет.

Описание технологии использования метода с указанием этапов

- 1. Проводят определение активности суставного синдрома по величине показателя DAS28, модифицированного для псориатического

артрита, который рассчитывают общепринятым методом. При значении DAS28 больше 5,1 выставляют высокий риск прогрессирования атеросклероза.

2. При значении DAS28 меньше или равного 5,1 проводят оценку тяжести поражения кожного покрова по величине индекса PASI, который рассчитывают общепринятым методом (Т. Fredriksson, U. Pettersson, 1979). При значении индекса PASI больше или равного 30 выставляют высокий риск прогрессирования атеросклероза.

3. При значении индекса PASI меньше 30 определяют сывороточную концентрацию аргиназы I (нг/мл).

3.1. Подготовка реактивов. Все реактивы должны быть комнатной температуры к началу использования. Реактивы, входящие в состав набора и готовые к использованию: антитела, покрывающие микротитровальные стрипы планшета; конъюгат раствор; растворитель для стандарта; буфер разбавления; раствор субстрата; стоп раствор. Реактивы, входящие в состав раствора в концентрированной или лиофилизированной форме: мастер стандарт человеческой аргиназы; контроль качества (высоко, низко); концентрат промывочного раствора.

3.1.1. Разводят лиофилизированный мастер стандарт со 180 μ l деионизированной воды для проведения исследования. Растворяют в течение 15 минут и полностью перемешивают. Итоговая концентрация человеческой аргиназы в готовом растворе составляет 320 нг/мл (0,032% раствор). Готовят набор стандартов, используя растворитель для стандартов, как показано в таблице 1.

Разводят подготовленные стандарты четырехкратно с буфером разбавления для проведения исследования, например 60 μ l стандарта + 180 μ l буфера разбавления для дубликатов. Приготовленные стандарты

используют в ELISA в течение 30 минут, т.е. готовят непосредственно перед внесением в планшеты.

Таблица 1 – Набор стандартов

Объем стандарта	Растворитель для стандарта	Концентрация
		320 нг/мл
75 µl 320 нг/мл	75 µl	160 нг/мл
75 µl 160 нг/мл	75 µl	80 нг/мл
75 µl 80 нг/мл	75 µl	40 нг/мл
75 µl 40 нг/мл	75 µl	20 нг/мл
75 µl 20 нг/мл	75 µl	10 нг/мл
75 µl 10 нг/мл	75 µl	5 нг/мл

3.1.2. Разводят каждый контроль качества (высоко и низко) с 60 µl деионизируемой воды для проведения исследования. Растворяют в течение 15 минут и полностью перемешивают. Разводят контроль качества четырехкратно с буфером разбавления для проведения исследования, например 60 µl контроля + 180 µl буфера разбавления для дубликатов.

3.1.3. Разводят концентрат промывочного раствора (10x) десятикратно в деионизированной воде для приготовления раствора, например 100 мл концентрата промывочного раствора (10x) + 900 мл деионизируемой воды.

3.2. Подготовка образцов. После забора крови центрифугируют ее немедленно (в пределах нескольких секунд). Пробирку с кровью центрифугируют при 1000 об/мин 10 минут (200g). Следы гемолиза и загрязнение сыворотки эритроцитами вызывают ложные завышенные результаты определения аргиназы I. При разбавлении сыворотку хорошо перемешивают на вортексе без вспенивания. Образцы немедленно

исследуют или хранят при -20°C либо, предпочтительно, при -70°C (тогда годны к использованию по крайней мере 1 год). Полностью перемешивают размороженные образцы только для проведения исследования. При исследовании не используют гемолизированные или липемические образцы.

3.3. Процедура проведения исследования.

3.3.1. Раскапывают 100 μl разбавленных стандартов, контролей качества, буфера разбавления (=Blank) и образцов, предпочтительно в дубликатах, в соответствующие лунки. Инкубируют пластину при комнатной температуре (25°C) в течение 1 часа на шейкере при 300 об/мин.

3.3.2. Промывают лунки трехкратно с промывочным раствором (0,35 мл в лунку). После заключительного мытья, опрокидывают и прижимают пластинку к абсорбирующему материалу – фильтровальная бумага.

3.3.3. Добавляют по 100 μl конъюгат раствора в каждую лунку.

3.3.4. Инкубируют пластину при комнатной температуре (25°C) в течение 1 часа на шейкере при 300 об/мин.

3.3.5. Промывают лунки трехкратно с промывочным раствором (0,35 мл в лунку). После заключительного мытья, опрокидывают и сильно прижимают пластинку к абсорбирующему материалу – фильтровальная бумага.

3.3.6. Добавляют 100 μl раствора субстрата в каждую лунку. Инкубируют планшет в темноте в течение 10 минут при комнатной температуре (25°C) без вспенивания.

3.3.7. Останавливают реакцию добавлением 100 μl стоп раствора.

3.3.8. На микропланшеточном ридере с длиной волны 450 нм определяют поглощение света в течение 5 минут после остановки реакции

при рабочей длине волны 450 нм с использованием фоновой длины волны 620 нм.

3.4. Вычисления. По данным концентрации и оптической плотности стандартов строится калибровочная кривая (логарифм среднего поглощения света (оптическая плотность) изображается против известной концентрации стандартов (нг/мл)) и высчитывается концентрация образцов.

4. По сочетанию активности суставного синдрома, тяжести поражения кожного покрова, сывороточной концентрации аргиназы I оценивают риск прогрессирования атеросклероза.

4.1. При значениях DAS28 от 3,2 до 5,1, включая 5,1, и индекса PASI от 10 до 30.

4.1.1. Сывороточная концентрация аргиназы I больше 200 нг/мл – выставляют высокий риск прогрессирования атеросклероза.

4.1.2. Сывороточная концентрация аргиназы I меньше или равна 200 нг/мл – выставляют средний риск прогрессирования атеросклероза.

4.2. При значениях DAS28 меньше или равного 5,1 и PASI меньше или равного 10 или DAS28 меньше или равного 3,2 и PASI меньше 30.

4.2.1. Сывороточная концентрация аргиназы I больше 200 нг/мл – выставляют средний риск прогрессирования атеросклероза.

4.2.2. Сывороточная концентрация аргиназы I меньше или равна 200 нг/мл – выставляют низкий риск прогрессирования атеросклероза (рисунок 1).

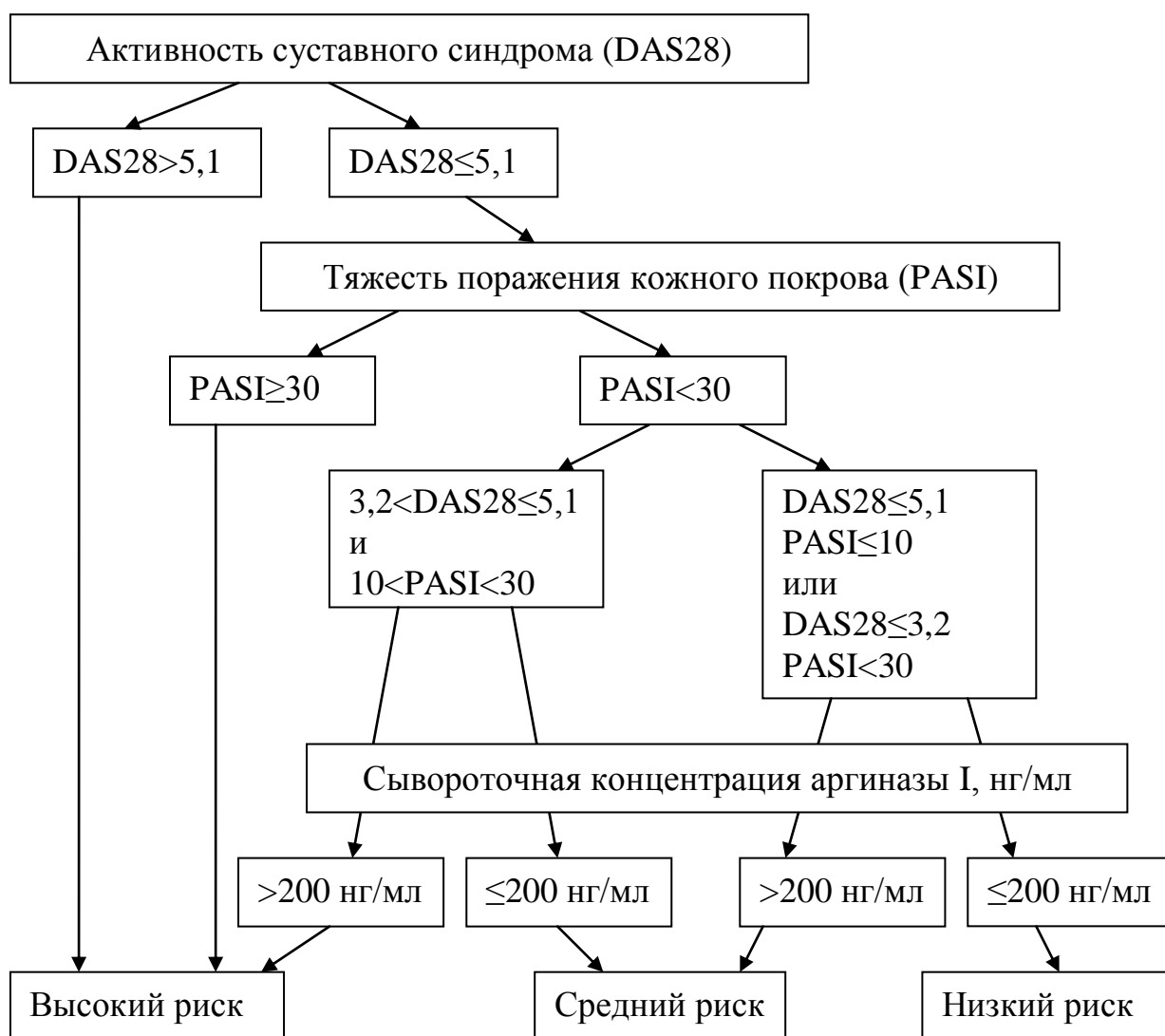


Рисунок 1 – Алгоритм оценки риска прогрессирования атеросклероза у пациентов с псориазом и псориатическим артритом

Интерпретация результатов исследования

Критерии высокого риска прогрессирования атеросклероза:

1. Высокая активность суставного синдрома ($DAS28 > 5,1$);
2. Тяжелая степень поражения кожного покрова ($PASI \geq 30$);
3. Сочетание умеренной активности суставного синдрома ($3,2 < DAS28 \leq 5,1$), средней степени тяжести поражения кожного покрова ($10 < PASI < 30$) и высокого сывороточного уровня аргиназы I (> 200 нг/мл).

Критерии среднего риска прогрессирования атеросклероза:

1. Сочетание умеренной активности суставного синдрома ($3,2 < \text{DAS28} \leq 5,1$), средней степени тяжести поражения кожного покрова ($10 < \text{PASI} < 30$) и нормального сывороточного уровня аргиназы I (≤ 200 нг/мл);
2. Сочетание умеренной ($3,2 < \text{DAS28} \leq 5,1$) или низкой активности суставного синдрома ($\text{DAS28} \leq 3,2$), легкой степени тяжести поражения кожного покрова ($\text{PASI} \leq 10$) и высокого сывороточного уровня аргиназы I (> 200 нг/мл);
3. Сочетание низкой активности суставного синдрома ($\text{DAS28} \leq 3,2$), средней ($10 < \text{PASI} < 30$) или легкой степени тяжести поражения кожного покрова ($\text{PASI} \leq 10$) и высокого сывороточного уровня аргиназы I (> 200 нг/мл).

Критерии низкого риска прогрессирования атеросклероза:

1. Сочетание умеренной ($3,2 < \text{DAS28} \leq 5,1$) или низкой активности суставного синдрома ($\text{DAS28} \leq 3,2$), легкой степени тяжести поражения кожного покрова ($\text{PASI} \leq 10$) и нормального сывороточного уровня аргиназы I (≤ 200 нг/мл);
2. Сочетание низкой активности суставного синдрома ($\text{DAS28} \leq 3,2$), средней ($10 < \text{PASI} < 30$) или легкой степени тяжести поражения кожного покрова ($\text{PASI} \leq 10$) и нормального сывороточного уровня аргиназы I (≤ 200 нг/мл).

Возможные осложнения и ошибки

Осложнений при применении данного метода не зарегистрировано.

Ошибки возможны при:

1. Нарушении методики исследования.
2. Нарушении длительности и (или) условий хранения сыворотки крови, компонентов набора.

3. Использовании сыворотки крови со следами гемолиза или загрязненной эритроцитами, липемической сыворотки крови.